

## ARTIKEL PENELITIAN

## Deteksi Koproantigen *Cryptosporidium* sp pada Pasien HIV/AIDS dengan Diare Kronis

Sri Wahdini,<sup>1\*</sup> Agnes Kurniawan,<sup>1</sup> Evy Yuniastuti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Parasitologi FK Universitas Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK Universitas Indonesia-  
RSUP Nasional dr. Cipto Mangunkusumo

\*Korespondensi: sri.wahdini@ui.ac.id

Diterima 12 Januari 2016; Disetujui 25 April 2016

### Abstrak

*Cryptosporidium* sp adalah salah satu protozoa penyebab diare pada individu imunodefisiensi seperti penderita HIV/AIDS. Deteksi koproantigen *Cryptosporidium* sp lebih sensitif dibandingkan dengan diagnosis etiologis secara mikroskopis. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan deteksi koproantigen *Cryptosporidium* sp pada pasien HIV/AIDS dan dibandingkan dengan hasil pemeriksaan mikroskopis. Sebanyak 95 sampel feses pasien HIV/AIDS dengan keterangan klinis diare kronik diterima oleh Laboratorium klinik Parasitologi FKUI, kemudian dilakukan pemeriksaan deteksi koproantigen dan mikroskopi dari pulasan feses yang telah diwarnai dengan modifikasi tahan asam (MTA). Frekuensi kriptosporidiosis menggunakan deteksi koproantigen sebesar 36,8% sedangkan dengan metode MTA hanya 11,6%. Sensitivitas dan spesifisitas koproantigen dibandingkan dengan pulasan tahan asam sebesar 100% dan 71,4%. Deteksi koproantigen perlu dilakukan pada pasien dengan kecurigaan tinggi terhadap kriptosporidiosis tetapi tidak ditemukan ookista pada feses.

**Kata kunci:** *Cryptosporidium* sp, HIV/AIDS, diare kronik, koproantigen.

## Detection of *Cryptosporidium* sp Coproantigen in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome Patient with Chronic Diarrhea

### Abstract

*Cryptosporidium* sp is one of protozoan that cause diarrhea in immunodeficient patients such as HIV/AIDS. Detection of coproantigen of *Cryptosporidium* sp is more sensitive than microscopic detection. The objective of this study is to detect cryptosporidiosis using coproantigen detection compare to microscopic detection from stool of HIV/AIDS patients with chronic diarrhea. A Total of 95 stool specimens from HIV/AIDS patients with chronic diarrhea were received by Laboratorium klinik Parasitologi Faculty of Medicine UI. The stool was tested using coproantigen and microscopy detection for cryptosporidiosis. The frequency of cryptosporidiosis using coproantigen detection was 36.8% while the MTA method was only 11.6%. Sensitivity and specificity of coproantigen detection compared with the microscopic was 100% and 71.4%. Detection coproantigen necessary in patients with high suspicion of cryptosporidiosis but oocysts detection was negative.

**Key words:** *Cryptosporidium* sp, HIV/AIDS, chronic diarrhea, coproantigen

## Pendahuluan

*Cryptosporidium* sp merupakan patogen oportunistik karena paling sering menyebabkan penyakit bila status imun hospes menurun. Gejala klinis dan berat penyakit kriptosporidiosis berkaitan erat dengan status kekebalan tubuh hospes dengan diare merupakan manifestasi klinis utama. Pada individu imunokompeten, diare yang disebabkan oleh *Cryptosporidium* sp bersifat *self-limiting* sedangkan pada individu imunokompromais diare bersifat kronis.<sup>1</sup> Selain menyebabkan diare kronis, *Cryptosporidium* sp dapat menyebar ke organ lain seperti saluran pernapasan karena memiliki kemampuan autoinfeksi internal sehingga pada individu imunokompromais perlu dilakukan deteksi sedini mungkin.

Pemeriksaan yang dilakukan terhadap 318 sampel feses pasien HIV dengan gejala diare pada periode November 2004 sampai Maret 2007 di Departemen Parasitologi FKUI ditemukan *Cryptosporidium* sp sebagai parasit terbanyak kedua setelah *Blastocystis hominis* yaitu sebesar 11,9%.<sup>2</sup> Nsagha et al<sup>3</sup> melaporkan infeksi *Cryptosporidium* sp secara bermakna didiagnosis pada pasien HIV dengan diare sebelum pemberian ARV ( $p=0,025$ ) dan pasien yang sedang mendapatkan terapi ARV dengan sel T CD4 < 200 sel/mm<sup>3</sup>. Sedangkan Shimelis et al<sup>4</sup> mendapatkan prevalensi infeksi *Cryptosporidium* sp sebesar 13,2% pada pasien HIV dengan atau tanpa diare dan memiliki hitung sel T CD4 < 200 sel/mm<sup>3</sup>.

Diagnosis etiologi kriptosporidiosis dapat dilakukan dengan menggunakan metode mikroskopis, deteksi antigen dengan immunoassay dan molekuler. Pada pemeriksaan dengan teknik mikroskopis diperlukan jumlah ookista yang banyak atau minimal  $1 \times 10^6$ /ml, tenaga laboratorium yang terlatih, berpengalaman dan memerlukan waktu yang lebih lama.<sup>5,6</sup> Infeksi awal saat ookista belum dikeluarkan dalam jumlah banyak melalui feses maka hasil pemeriksaan mikroskopis akan negatif. Selain itu ookista dikeluarkan secara intermiten dan jumlahnya bervariasi dari hari ke hari. Pada kasus dengan kecurigaan tinggi terhadap kriptosporidiosis tetapi tidak ditemukan ookista pada feses maka perlu dilakukan pemeriksaan dengan teknik lain salah satunya adalah deteksi antigen. Kaushik et al<sup>7</sup> melaporkan 4,9% kriptosporidiosis pada pasien HIV dengan teknik pewarnaan ZN sedangkan dengan pemeriksaan deteksi koproantigen didapatkan sebesar 18,9%. Dagan et al<sup>8</sup> menyebutkan beberapa kelebihan teknik

imunoenzim untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp yaitu lebih sensitif, spesifik, mudah, tidak memerlukan tenaga laboratorium yang terlatih dan berpengalaman. Selain itu teknik imunoenzim dapat dilakukan terhadap feses yang telah disimpan dalam preservasi tanpa mempengaruhi hasil sehingga dapat digunakan dalam penelitian lapangan atau skrining dengan jumlah sampel yang banyak. Spesimen untuk pemeriksaan imunoenzim tidak perlu dikonsentrasi atau melalui proses apapun dan hasil dapat dibaca secara visual dengan melihat ada tidaknya perubahan warna.

Deteksi ookista *Cryptosporidium* sp dari pulasan yang diwarnai modifikasi tahan asam sekalipun memiliki spesifisitas yang tinggi, akan tetapi memiliki sensitivitas yang rendah sehingga sulit mendeteksi kasus asimtomatis atau infeksi parasit dengan intensitas rendah. Untuk itu perlu dilakukan diagnosis kriptosporidiosis menggunakan teknik deteksi selain mikroskopis.

## Metode

Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional* yang dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Sampel dikumpulkan dari pasien yang mengirimkan feses untuk pemeriksaan feses parasit. Sampel feses dipilih yang memiliki keterangan klinis pasien HIV/AIDS dengan diagnosis diare kronis. Rumus besar sampel minimal yang digunakan adalah rumus untuk estimasi proporsi suatu populasi yaitu:  $n = Z\alpha^2 PQ / d^2$ , dengan Estimasi proporsi kejadian pada populasi 18,9% (0,189) dengan derajat ketelitian, ditetapkan 8% (0,08). Berdasarkan rumus tersebut didapatkan besar sampel minimal yang diperlukan sebesar 92 sampel.

Sampel feses dibagi menjadi dua yaitu untuk pemeriksaan mikroskopis dan sebagiannya di awetkan dengan formalin 10% dengan perbandingan feses dan formalin sebanyak 1:3. Sampel feses untuk pemeriksaan mikroskopis langsung di proses dengan teknik konsentrasi formalin eter dan dilanjutkan dengan pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA). Pembuatan preparat mikroskopis dan pembacaan dilakukan oleh dua teknisi laboratorium terlatih.

Sedangkan sampel feses yang diawetkan disimpan di dalam lemari pendingin untuk nanti dilakukan pemeriksaan koproantigen secara bersamaan. Pemeriksaan koproantigen *Cryptosporidium* sp menggunakan kit *Cryptosporidium* sp *Diagnostic automation*,

inc. *Microwell* ELISA *Cryptosporidium*, kat. 8301. Prosedur kerja dilakukan sesuai dengan petunjuk kerja yang tersedia di dalam kit. Hasil dapat dibaca secara visual atau dengan *ELISA reader* pada 450nm.

### Hasil

Sebanyak 95 feses yang disertai dengan keterangan HIV/AIDS dan diagnosis atau keterangan diare kronis diterima oleh Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia untuk pemeriksaan feses parasit. Tabel 1, memperlihatkan perbandingan hasil deteksi *Cryptosporidium* sp deteksi koproantigen dengan

ookista dari pulasan feses yang telah diwarnai MTA. Hasil pemeriksaan ookista dengan pulasan MTA ditemukan 11 sampel positif *Cryptosporidium* sp, sedangkan pada deteksi koproantigen menggunakan imunoenzim (ELISA) didapatkan 35 sampel hasil positif dengan 24 diantaranya tidak ditemukan ookista *Cryptosporidium* sp. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,000$ ) antara hasil pemeriksaan koproantigen dengan deteksi ookista dengan pulasan MTA. Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas deteksi koproantigen terhadap metode MTA yaitu sebesar 100% dan 71.4%. Nilai prediksi positif

**Tabel 1. Hasil Deteksi *Cryptosporidium* sp pada Pasien HIV/AIDS Berdasarkan Pulasan MTA dan Pemeriksaan Koproantigen**

Pemeriksaan	Hasil MTA		Total
	+	-	
Koproantigen	+	11	24 (36.8%)
	-	0	60 (63.2%)
Total	11 (11.6%)	84 (88.4%)	95 (100%)

(NPP) 31.4% dan nilai prediksi negatif (NPN) 100%.

Tabel 2. memperlihatkan hasil pemeriksaan koproantigen *Cryptosporidium* sp berdasarkan jenis parasit yang ditemukan pada pemeriksaan mikroskopis. Berdasarkan pemeriksaan mikroskopis *Cryptosporidium* sp merupakan jenis parasit terbanyak kedua setelah *Blastocystis hominis*, yaitu sebanyak 11 dari 95 sampel baik sebagai infeksi tunggal (6 sampel) maupun infeksi campur

dengan *Blastocystis hominis* (4 sampel) dan *B. hominis*, *Entamoeba coli* (1 sampel). Semua hasil pemeriksaan *Cryptosporidium* sp positif dengan mikroskopis memberikan hasil koproantigen positif. Sedangkan pemeriksaan menggunakan mikroskopis yang dinyatakan negatif, *B. hominis* atau *G. lamblia* menunjukkan hasil deteksi koproantigen positif masing-masing sebesar 12/44 sampel, 10/36 sampel dan 2/4 sampel.

**Table 2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis dan Deteksi Koproantigen *Cryptosporidium* sp pada Feses pasien HIV/AIDS**

Spesies Parasit	N=95	Koproantigen positif
Negatif	44	12
<i>B. hominis</i>	36	10
<i>G. lamblia</i>	4	2
<i>Cryptosporidium</i>	6	6
<i>B. hominis</i> , <i>Cryptosporidium</i>	4	4
<i>E.coli</i> , <i>B. hominis</i> , <i>Cryptosporidium</i>	1	1

## Diskusi

Penelitian ini dilakukan terhadap sampel feses pasien HIV dengan diare kronik yang dikirim ke Laboratorium Parasitologi. Diagnosis kriptosporidiosis yang digunakan secara umum adalah deteksi ookista pada pulasan yang diwarnai MTA dengan menggunakan mikroskop cahaya. Pemeriksaan ini sangat ditentukan oleh kemampuan dan pengalaman tenaga laboratorium. Penelitian ini menggunakan antibodi poliklonal anti-*Cryptosporidium* yang akan mengenali antigen *Cryptosporidium sp* pada supernatan feses, dan antibodi sekunder yang dilabel enzim (*sandwich* ELISA) yang merupakan anti-antibodi pertama (produk *Diagnostic Automation, Inc Cryptosporidium*).

Kedua teknik pemeriksaan tersebut mudah untuk dilakukan. Pada pemeriksaan mikroskopis, proses konsentrasi atau sedimentasi feses sangat dianjurkan untuk meningkatkan hasil deteksi parasit walaupun akan menambah waktu dan biaya pemeriksaan. Deteksi koproantigen menggunakan ELISA, tidak perlu melalui tahap konsentrasi karena akan mempengaruhi keakuratan hasil.<sup>9</sup> Interpretasi hasil mikroskopis lebih sulit daripada ELISA, membutuhkan tenaga berpengalaman dan pembesaran hingga 1000X. Hasil pemeriksaan ELISA dapat dibaca secara visual tanpa memerlukan spektrofotometer sehingga pemeriksaan ini dapat dilakukan pada penelitian survey lapangan dan dilakukan pada laboratorium yang tidak dilengkapi spektrofotometer. Pembacaan dengan bantuan spektrofotometer sangat berguna untuk penentuan hasil pemeriksaan yang *borderline*.<sup>10,11</sup>

Pada penelitian ini, dengan teknik pewarnaan modifikasi tahan asam didapat hasil sebesar 11,6% (11/95), sedangkan dengan deteksi koproantigen didapat 36,8% (35/95). Kaushik<sup>7</sup> melaporkan 4,9% kriptosporidiosis pada pasien HIV dengan dan tanpa diare menggunakan teknik pewarnaan ZN dan 18,9% dengan pemeriksaan deteksi koproantigen. Deteksi infeksi *Cryptosporidium sp* pada populasi anak dengan diare yang dilakukan oleh Nevien et al<sup>12</sup> didapatkan 15,3% menggunakan deteksi koproantigen dan 11,3% menggunakan deteksi ookista dengan pewarnaan kinyoun. Perbedaan antara hasil pemeriksaan deteksi ookista dan koproantigen yang cukup besar pada penelitian ini dapat terjadi karena tidak dilakukan kriteria inklusi pada perjalanan penyakit pasien. Pada awal penyakit jumlah ookista yang disekresi masih di bawah ambang pemeriksaan mikroskopis. Selain itu teknik mikroskopis tidak dapat mendeteksi

stadium selain ookista sedangkan pada tahap penyembuhan kriptosporidiosis, antigen atau produk dari *Cryptosporidium* masih dikeluarkan melalui feses walaupun tanpa ookista utuh.<sup>13</sup>

Kelebihan deteksi koproantigen yaitu dapat mengidentifikasi pasien kriptosporidiosis yang pada saat dilakukan pengumpulan feses tidak terjadi ekskresi ookista<sup>13</sup> dan pengumpulan feses hanya perlu dilakukan satu kali. Pada pemeriksaan mikroskopis dianjurkan untuk dilakukan pemeriksaan 2-3 sampel feses berbeda yang diambil pada hari berturut-turut atau selang sehari sehingga akan meningkatkan angka deteksi parasit. Cartwright<sup>14</sup> menganjurkan pemeriksaan dua spesimen feses saja karena pemeriksaan ketiga hanya memberikan informasi tambahan pada 8% kasus, sedangkan pemeriksaan dua spesimen sudah memberikan sensitivitas deteksi sebesar 92%. Berdasarkan hasil studi Branda<sup>15</sup> menyatakan bahwa pemeriksaan spesimen tunggal secara komprehensif sudah mencukupi jika prevalensi infeksi parasit tersebut di populasi mencapai 20%.

Nilai sensitivitas dan spesifisitas dapat saling mempengaruhi satu sama lainnya, dimana makin rendah spesifisitas makin tinggi sensitivitasnya demikian juga sebaliknya. Hasil ini berbeda dengan penelitian Marques<sup>16</sup> yang mendapatkan nilai sensitivitas 100%, spesifisitas 96%, NPP dan NPN sebesar 89% dan 100% yang menggunakan ELISA dari Alexon, Inc, BIOBRAS. Pada penelitian Jayalakshmi<sup>17</sup> didapatkan sensitivitas dan spesifisitas ELISA (RIDASCREEN *Cryptosporidium*, R-Biofarm, Germany) dibandingkan dengan MTA sebesar 90,9% dan 98,7%. Perbedaan ini karena konsistensi feses, alat yang digunakan dan kemampuan pemeriksa pada tiap penelitian serta pemilihan kit diagnostik yang menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal. Faktor visual dan psikologis pemeriksa sangat berpengaruh dalam penegakan diagnosis.

Semua hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* positif dengan mikroskopis memberikan hasil koproantigen positif. Spesimen yang tidak terdeteksi ookista *Cryptosporidium sp* secara mikroskopis tetapi positif secara koproantigen menunjukkan kemungkinan pasien terinfeksi *Cryptosporidium sp* tetapi jumlah ookista yang diekskresikan di bawah ambang deteksi mikroskopis yaitu  $1 \times 10^6$  ookista/ml feses. Kemungkinan lain adalah adanya reaksi silang antibodi *Cryptosporidium sp* dengan parasit usus lain karena antibodi yang digunakan merupakan antibodi poliklonal, walaupun beberapa

penelitian sudah melaporkan bahwa tidak ditemukan reaksi silang antibodi dengan parasit usus lainnya.<sup>9,13</sup>

### Kesimpulan

Frekuensi kriptosporidiosis pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronik dengan deteksi koproantigen sebesar 36.8% lebih tinggi daripada MTA 11.6%. Deteksi koproantigen perlu dilakukan pada pasien dengan kecurigaan tinggi terhadap kriptosporidiosis tetapi tidak ditemukan ookista pada feses.

### Daftar Pustaka

1. Susanto L, Gandahusada S. *Cryptosporidium* sp. Dalam Sutanto I, Ismid IS, Sjarifuddin PK, Sungkar S, editors. Parasitologi Kedokteran. Edisi keempat. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2008. hal. 171-5.
2. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, Smith HV. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. Trans of the royal society of tropmed and hygiene. 2009;30:1-7.
3. Nsagha DS, Njunda AL, Assob NJ, Ayima CW, Tanue EA, Kwenti TE. Intestinal parasitic infections in relation to CD4+ T cell counts and diarrhea in HIV/AIDS patients with or without antiretroviral therapy in Cameroon. BMC infectious diseases. 2016 Jan 11;16(1):1.
4. Shimelis T, Tassachew Y, Lambiyo T. Cryptosporidium and other intestinal parasitic infections among HIV patients in southern Ethiopia: significance of improved HIV-related care. Parasites & vectors. 2016 May 10;9(1):1.
5. Mehta P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Postgrad Med 2002;48:217.
6. Weber R, Byan RT and Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. J Clin Microbiol. 1992;30(11):2869-73.
7. Kaushik K, Khurana S, Wanchu A, Malla.N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of Cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. Acta Trop. 2008;107(1):1-7.
8. Dagan R, Fraser D, El-On J, Kossis I, Deckelbaum R, Turner S. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* sp. In stool specimens from infants and young children in field studies. Am. J. Trop. Med. Hvg. 1995;52(2):134-8.
9. Rosenblatt JE, Sloan L. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Cryptosporidium* in stool specimens. J.Clin. Microbiol. 1993;31(6):1468-71.
10. Silva C.V, Ferreira M, Goncalves-Pires MR, Costa-Cruz JM. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immunodeficiency syndrome patient by using a commercially available immunoenzymatic assay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(8):1097-99.
11. Dagan R, Fraser D, El-On J, Kossis I, Deckelbaum R, Turner S. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* sp. In stool specimens from infants and young children in field studies. Am. J. Trop. Med. Hvg. 1995;52(2):134-8.
12. Nevine S, Mona M, Samar S. Detection of *Cryptosporidium* infection among children with diarrhea. New York Science Journal. 2012;5(7):68-76.
13. Ungar BP. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens. J Clin Microbiol 1990;28:2491-5.
14. Cartwright CP. Utility of multiple stool specimen ova and parasite examination in a high prevalence setting. J Clin Microbiol 1999;37:2408-11.
15. Branda JA, Lin TYD, Rosenberg ES, Halpem EF, Ferraro MJ. A rational approach to the stool ova and parasite examination. Clin Infect Dis 2006;42:972-8.
16. Merques RF, Cardoso LV, Cavanini CE, Carmem M, Bassi NA, Gottardo MT, et al. Performance of an Immunoenzymatic assay for *Cryptosporidium* diagnosis of fecal sample. The BJID. 2005;9(1):3-5.
17. Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. Indian J. Pathol and Microbiol. 2008;51(1):137-8.